

TRYPTOPHAN OPERON, PEPTIDE AND PROTEIN CODED THEREBY, UTILIZATION OF TRYPTOPHAN OPERON GENE EXPRESSION AND PRODUCTION OF TRYPTOPHAN

[71] Applicant: AJINOMOTO CO INC

[72] Inventors: MATSUI KAZUHIKO;
SANO TAKANOSUKE;
MIWA KIYOSHI;
OTSUBO EIICHI

[21] Application No.: JP61087600

[22] Filed: 19860416

[43] Published: 19871024

[illegible]

Go to Fulltext

[57] Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce the titled tryptophan in a large amount, by cultivating a microorganism transformed by a DNA sequence capable of coding an enzymic group of a tryptophan synthetic system, etc., in a culture medium.

CONSTITUTION: A chromosomal gene obtained by extracting microbial cells of *Brevibacterium lactofermentum*, etc., of the genus *Brevibacterium* is cleaved with a restriction enzyme to give a DNA, consisting of DNA expressed by the formula containing an operator region controlling the synthesis of m-RNA, promoter region controlling the synthesis of m-RAN, etc. The resultant DNA is then subjected to ligation reaction with a plasmid vector to afford a recombinant DNA, which is further introduced into a variant strain requiring tryptophan to carry out transformation and provide coryneform bacteria having the ability to produce tryptophan. The resultant bacteria are then aerobically cultivated in a culture medium containing a carbon source, nitrogen source, etc., to produce and accumulate the aimed tryptophan in the culture medium. COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

[51] Int'l Class: C12N01500 C07H02104 C07K01300 C12P01322
C12P02102 C12P01322 C12R00113 C12P01322 C12R00115

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244382

⑪ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 N 15/00

7115-4B

C 07 H 21/04

7138-4C

C 07 K 13/00

8318-4H

C 12 P 13/22

A-7236-4B ※審査請求 未請求 発明の数 8 (全20頁)

⑭ 発明の名称 トリプトファンオペロン、トリプトファンオペロンにコードされる
ペプチド及び蛋白、トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用方法
及びトリプトファンの製造法

⑯ 特 願 昭61-87600

⑰ 出 願 昭61(1986)4月16日

特許法第30条第1項適用 昭和60年11月15日 日本分子生物学会発行の「第8回日本分子生物学会年
会プログラム・講演要旨集」により発表

⑱ 発 明 者 松 井 和 彦 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑲ 発 明 者 佐 野 孝 之 輔 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
⑳ 発 明 者 三 輪 清 志 川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内
㉑ 発 明 者 大 坪 栄 一 東京都文京区西片1-13-6
㉒ 出 願 人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

トリプトファンオペロン、トリプトファン
オペロンにコードされるペプチド及び蛋白、
トリプトファンオペロンの遺伝子発現利用
方法及びトリプトファンの製造法

2. 特許請求の範囲

1) m-RNA の合成をコントロールするオペレー
ター領域、m-RNA の合成をコントロールするプロ
モーター領域、m-RNA の合成をコントロールする
アテニューエーター領域、蛋白合成に必要なリボゾ
ームとm-RNA との結合領域、リーダーペプチドを
コードする領域、トリプトファン合成系の酵素群
をコードする領域及び最後にm-RNA の合成を停止
させるシグナルを形成するターミネーター領域が
含まれる下記第一式に示される配列よりなるDNA

CCGGCTTCTG GGCATTGCTG TCCCTGAGGT GCGTAAATCC CAAGAATTGT GGGATATGGC GCACCGTCTC GCTGGCCCGT TGTGGGTGCT GTGGGGAGTT
 GGGCCAAACAC CCGTAAGCAC AGGGACTCCA CGCATTTAGG GTTCTTAACA CCGTATACCG CGTGGCACAG CGACCCGGCA ACACCCACGA CAGCCCTCAA
 TCCTTTGTTA TTGCTCCCT ACTTGCGTTT GTGGCTTCT GTTTGGATCT GCGTGGTCTT GGCATTGGGT GTTGTGGCTG CCATCGTGT CATTGGCATG
 AGGAAACAAT AACGGAGCGA TCAACGCAAA CACCGGAAGA CCAACCTACA CCGACACGA CCGTAACCCA CAACAGCGAC GGTAGCACAA GTAACCGTAC
 GGTGGGGTA TGGCTGCGCA TACTGTTECG ATGGTTGATG CGAACGCAGT CGCGAAACCC CGCAGGCGCG TGTTCCTGCT GAAATTGAAG AGGAGGCGCG
 CCACGCCCCAT ACCGACGCGT ATGACAACCG TACCAACTAC GCTTGGCTCA GCGCTTTGGG GCGTCCGCGG ACAAAGGCGA CTTTAACCTC TCCTCGGCGC
 TGGTGTGACT ATTACCTCGC CGATTATCAA CAGACTCCG CTGAATGCCC CCAAGATTGA CTTCGATGCA GTGGGTAGAG CTGGCGAAAG TACACAAGAA
 ACCACACTGA TAATGAGCG GCTAATAGTT GTTCTGAGGC GACTTACGGG GGTCTAACT GAACCTACGT CAGCGCATCTC GACGCTTTTG ATGTGTTCTT
 CCGAAAATG ATTAATAATT CAGACAAGCT TCCCACTATG TGATAAGTC CCATTTTCTG AATACTCTT GTCTCAGTCA AAGCACCAG TGGTGGTGGC
 GGTTTTTAC TAATTATTAA CTCTGTTCCA AGCGTGATAC ACTATTTCAG GGTAAACAC TTAATTGAGAA CAGACTCAGT TTCGTGGCTC ACCACACCG
 GCGTAACTA AGCGAGCCTG ACACCTCAAG TTGTTTTAC TTTGATGAAT TTTTAAAGCG TCGTACTTCG TTCCAGCAAG AAGCGGCGCT TTTGTGTTT
 CCGGATTGAT TCGCTCGGAC TGTGAGTTC AACAAAAGTG AAACCTACTTA AAAAATTCCG AGCATGAAGC AAGCTGCTTC TTCGCGCGGA AACACCAAA
 TTAGCCCAAC ACCGGAACCG CCGGATCGA ATGAAGCTCG CAGCGAGTAA TTATTGATG TTTCCAGAA AGGCTTCAGC CCCACAATGA TTTCTCGGT
 AATCGGGTGT TGGCGTTTC GGACCTAGCT TACTTCGAGC GTGCGTCATT AATAAATAC AAAGGGTCTT TCGGAAGTC GGTGTACT AAAGGAGCA
 AGGTGCCCCA TGAGCAGGAA TCCCATGTT TTCTCCCTAG ATGTCCGCTA TCACGAGGAT GCTTCTGCTT TGTTCGCCA CTTCGGTGGC ACAACCGCAG
 TCCACGGGGT ACTGTGCTT AGCGGTACAA AAGCGGATC TACAGCGGAT AGTGTCTCTA CGAAGACGCA ACAACGGGT GAACCCACCG TGTGGCGTC
 ATGATGCAGC CCGTTGGAA AGCGCTGATA TCACCACCAA GAATGCTATT TCTTCCCTCG CCGTGTGAA GAGTTCGGTG CGCATTAGT GCACGGGCAA
 TACTACGTCG GCACAACCTT TCGCGACTAT AGTGGTGGT CTTACCATAA AAGAGGGAGC GCCACAACCT CTCAGGCCAC GCGTAATGA CGRPFCCGTT

CAGGGTGCTA AGCGAGCGCG TGACGGACTC GGTAGGGCA GTGGTTGCGC CGCTAACACA GCAGCTTGGC CAGTACAACA CCGCAGAGAA CACCTTTAGC
 GTGCCACCAT TCGCTCGGCG ACTGCGTCAG CCGATCCGCT CACCAACCGC CCGATTGTGT CCGCGAACCG GTCATGTTGT GCGGTCTCTT GTGGAATCG
 TTCCCGCGCT CCGATCGCGT TGATGAGCGC GAGCGGCTCA CCGCACCAAG CACCATCGAA GTGCTGCCA AGTTCAGTT CGACTCCGC TACAGCGAGC
 AAGGGCGGGA CGCTACGCGA ACTACTCGCG CTCGCGGAGT GCGCTGCTTC GTGTAGCTT CAGCAGCGCT TCAACCTCAA GCTCAGCGCG ATGTGCTGCG
 CGTCCCTGCC ACTGCTCATG GCGGTTTTC CTTTGATTT CTTAGAACC TTTGAAACCG TCCCGCAGT CGAGGAAAGC GTCAACACTT ACCCGGATTA
 GCAGGAGCGG TGACGAGTAC CCGCAAAAGC GGAACATAA GAATCTTTGG AAATTTTGG AGGCGGCTCA GTCCTTTTC CAGTTGTGAA TCGGCTAAT
 CCAGTTCGTC CTCGCGGAAA TCGTCTGGA CATCAATCAC CAGGACCAGA CCGCCAAACT CACCGCGCTC TCCAACGCGC CAGGCGAGCT CGAGCGGAG
 GGTCAAGCAG GAGCGGCTTT AGCAGGACCT GTAGTTAGTG GTCTGCTCT GCGGTTTGA GTGGCGCGAG AGGTTGCGCG GTCCGCTCGA CTTCCGCTC
 CTCACAAGC TTTCAATTGT TATCGAGCGC GCGCTCCCGC CAACCGAACA CGCTACCAA ACCACCCCTC ACCAGCGCGA CACTGTTGCG GTTGTGGCTG
 GAGTGTGTCG AAGCTAACGA ATAGCTCGCG GCGGAGGGCG GTTGGCTGT GTGGATGCTT TGGTGGGAG TGTCCCGCT GTGAGAGCG CAACACCGAC
 ATATTCCCGA TGCTCAGTTC CGCACTCAGA TCAATGAGCT GAAAGAAAAC ATTTACAAGC GTGACATCTA CCAAGTTGTC CCGCGCGCGA CTTTACCGCG
 ATATTGGGCT ACGAGTCAAG CCGTCACTCT ACTTACTCGA CTTTCTTTTG TAAATGTTGC CACTGTAGAT GGTTCACAG GCGCGCGCGT GAAAGTGGCG
 ACCATGTCCT GATGCAATTC CTGCTTATCT GCAGCTCGCT GCCACCAACC CGTCGCGCTA CATGTTCTAT ATCCGTGCGC TCAACGAAGC TCGTCTCTAT
 TGGTACGGA CTACGTAAAG GACGAATAGA CGTCCACCGA CCGTGGTTGG CGAGCGGCA GTACAAGATA TAGGCACCTG AGTTGCTTCC AGCGAGGATA
 CACTTTTTG GCGCATCCCC TGAGTCCAAC CTCAGTTCA CCGCTGCTAA CCGTGAGCTG CAGCTGTACC CAATCGCAGG TACCGCGCGC CGTGGACTCA
 CTTCAAAAAC CCGTAGGGG ACTCAGGTTG CAGTTCAACT GCGCAGGATT GCGACTCGAC GTGACATGG GTTAGCGTCC ATGGCGCGCG CCACCTCAGT
 ACCGAGATGG CTCATCAAC GATGAGCTAG ATATCCGCAA TGAGTTGGAT ATGCGCAGT ATGCCAAGA GATCGCGGAC GACACCATGC TGTGCTGCT
 TGGCTTACC GAGGTAGTTG CTACTCGATC TATAGCGCTT ACTCAACCTA TACGCGTAC TACGGTTTCT CTAGCGCGCT CTGTGGTACG AACAGCTAGA
 CCGCGGCAAC GACCTCGCGC GCGTCTCGGT CCGAGCGTGC CCGCGGTTG CCGATCTTTT GCAGGTGGAT CGCTATTCCC CCGTGATGCA CTTGCTGTC
 CCGCGGCTTG CTGGAGCGCG CGCAGCGCA GCGTCCGAGC GCGCGCAAC GCTAGAAAA CGTCCACCTA CGGATAAGGG CGCACTACCT GAACACAGG

特開昭62-244382 (3)

CGTGTGACCG CGACGTTGGA CCCAGAGCTT GATGCTTTGG ACGCCTATCG GCGGTGCATG AATATGGGCA CGTTGACCGG CGCTCCGAAG TTGCGCGCTA
GCACACTGCC GCTGCAACCT GGGTCTCGAA CTACGAAACC TCGGGATAGC CGGACGCTAC TTATACCGGT GCAACTGGCC GCGAGGCTTC AACCGCGCAT

TGGAGCTGTT GCGCGGCGTC GAAAGCGCA GCGGTGTTTC TTATGGTGGG CGAGTGGGGT ACCTGCGCGG CAATGGCGAT ATGGATAATT GCATTGTTAT
ACCTCGACAA GCGCGGCGAG CTTTTGCGGT CCGCACCAAG AATACCACCC GGTACCCCA TGGACGCGCC GTTACCGCTA TACCTATTAA CGTAACAATA

TCGTTGCGGG TTTGTCCAGG ATGGTGTGGC TGCTGTCCAG GCTGGTGCTG GTGTGGTCCG CGATTCTAAT CCTCAATCTG AAGCCGATGA GACGTTCCAC
AGCAAGCCCG AACAGGTCC TACCACACCG ACGACATGTC CGACCCAGAC CACACCAGCG GCTAAGATTA GAGTTAGAC TTCGGCTACT CTGCAACGCG

AAGCGGTATG CCGTGTGAA TGCCATTGCG CTTGCTGCTG GTTCCACTTT GGAGGTCATC CGATCACACA CGTTGTTCTC ATTGATAATC ACGATTCTTT
TTCCGCATAC GGCACAACTT ACGGTAAAGC GAACGACGAC CAAGGTGAAA CCTCCAGTAG GCTACTGTGT GCAACAAGAG TAAGTATTAG TGCTAAGAAA

TGCTACAAAC CTGGTGGATG CGTTGCGCGT GCGCGGTTAT AAGTCCACGG TGTTCCGCAA TACGGTGCCA GTTGAACCA TTTTCCGAGC CAACCCGGAC
ACAGATGTTG CACCACTTAC GCAAGCGGCA CCGGCAATA TTACGTTGCC ACAAGCGGTT ATGCCACGGT CAACTTTGGT AAAACCGTGC GTTGGCGCTG

CTGATCTGCC TTTACCTGG ACCTGGTTAC CTTGCCGATG GCGGCAACAT GATGCGCGTG ATCGAGCGCA CACTCGGCGA GATTCTTTTA CTGGCTATTT
GACTAGACGG AAGTGGAGC TGGACCAATG GGACGGCTAC GCGCGTTGTA CTACCGCGAC TAGCTCGCGT GTGAGCGCGT CTAGCGAAAT GACCCAATAA

GCGTGGGCTA CGAGGCACTC ATCGAATACC ACGCGGCGAA GGTGAGCCTT TGTCGCCCTG TGCACGGCAC CACCGACAAC ATGATCCTTA CTGATCGAGC
CGGAGCGCAT GGTCCGTGAG TAGCTTATGG TGCGCGCGTT CCAACTCGGA ACACCGGAC ACCTGCCGTG CTGGCTGTTG TACTAGGAAT GACTACGTCC

TGTGCAGAGC CCGTTTTTTC CAGGTCTTGG CACTGATGTT GAGCCTGATC ATCCAGAAGT CCCAGGCGCG AAGGTTCCAA TTGCGCGTTA TCACTCACTG
ACAGCTCTCG GGACAAAAAC GTCCAGAACC GTGACTACAA CTGGCACTAG TAGGTCTTCA GGGTCCGGCG TTCCAAGGTT AACCGGCAAT AGTGAATGAC

GCGTGGCTGG TTGCCCCAGA CGGTATTGAA TCATTGGGCA CCGTCTTCTC TGAGATTGGT GATGTATCA TGGCGGACCG CACCAACCGT GGAAGGCGCA
CGGACGCAAC AACGGGCTCT GGCATAACTT AGTAACCGGT GGACAAGGAG ACTCTAACCA CTACAGTAGT ACCGCGCTGC GTGGTGGCTA CTTTCCGGT

TTGGCCTGCA GTTACCCCT GAGTCAGTGC TGAGCCCAAC GGGTCTATC ATTTGTCCC GCTGTGTGGA ACAACTTCTC GCGAATAAT AAAAGGATT
AACCGGACGT CAAAGTGGGA CTCAGTCAGC ACTCGGGTTG CCCAGGATAG TAAACAGCGG CGACACAGCT TGTGAAGAG CGCTTGATTA TTTTCTCTAA

TGATTATGA CTTCCTCAGC AACACTGAAA GTTCTCAACG CCTACTTGGA TAACCCCACT CCAACCTCG AGGAGGCAAT TGAGGTGTTG ACCCCGCTCA
ACTAAGTACT GAAGAGCTCG TTGTGACTTT CAAGAGTTGG GATGAACCT ATTGGGGTGA GGTGGGACC TCCTCCGTTA ACTCCACAAG TGGGCGCACT

CGCTGGCTGA ATACGATCAC GTGCACATCG CAGCGCTGCT TCGGACCATC CGTACTCGCG GTGAGCACTT CGCTGATATT GCGGCGCGTG CCAAGGCATT
GGCAECCACT TATGCTACTG CAGCTGTAGC GTCGCGACGA ACGCTGGTAG GCATGAGCGC CACTGCTCA GCGACTATAA GCGCGCGGAC GGTTCGTTAA

CCTCGCGCGG GCTCGTCCGT TCCCGATTAC TGGCGCAGGT TTGCTAGATT CCGCTGGCAC TGCTGGCGAC GGTGCCAACA CCATCAACAT CACCAACCGG
GGAGCGCGCG CGAGCAGGCA ACGGCTAATG ACGCGCTCCA AACGATCTAA GCGGACCGTG ACCACCGCTG CCACGCTGTG GGTAGTTCTA GTGGTGGCGG

GCTTCCCTGA TCGCAGCATC CGGTGGAGTC AAGCTGGCTA AGCACGGCAA CCGTTCAGTG AGCTCCAAGT CCGGTTCCCG CGATGTGCTG GAGGGGCTGA
CGAAGGCACT AGCGTCTAG GCCACCTCAC TTGGACCGAT TGCTGCCGTG GCAAGTCACT TCGAGGTTCA GCGCAAGGCG GCTACAGCAC ATCGCGCACT

ATATTCTTTT GCGGCTTGAT GTGGATCGTG CTGTGAAGTG GTTGAAGCG TCCAACCTTA CTTTCTGTT CACACCTGCG TACAACCTG CGATTGCGCA
TATAAGGAAA CCGGGAACCTA CACCTAGCAC GACACTTCAC CAAGCTTCG AGGTTGAAGT GGAAGGACAA GTGTGACCG ATGTTGGGAC GCTAAGCGCT

TGTGCAGCGG GTTCCGCGAG CGCTGAAAT CCCACCATC TTCAACACCG TTGGACCAAT GCTGTCCCGG GCGCGCGCGG ACGCTCAGAT CATGGCGGTG
ACACGTCCGG CAAGCGGTCC GCGACTTTAA GGGTGGTAG AAGTTGTGCG AACCTGGTAA CGACAGGGCG GCGCGCGCGG TCGCAGTCTA GTACCGCGAC

GCCAATGCCA ATCATGGACA GCTCATCGCG GAGCTCTTCC GCGAGCTCGG CCGTACACCG GCGCTTCTTG TCGATGGCGG ACGCACCGAT GAGATCGCAG
CGCTTACGGT TAGTACCTGT CGAGTAGCGG CTCCAGAGG CGCTCGACCG GCGATGTGCG GCGGAACAAC ACGTACCGCG TCCTGGGCTA CTCTACCGTC

TCCACGGCAC CACCTTGGTG TGGGAGCTTA AGAAGACGG CACCATCGAG CATTACACCA TCGAGCCTGA GGACCTTGGC CTTGGCGCGT ACACCTTGA
AGGTGCCGTG GTGGAACCA ACCTCGAAT TTCTTCTGCC GTGGTAGCT GTAATGTGT AGCTCGGACT CCGGAACCG GAACCGCGCA TGTGGGAAT

GGATCTCGTG GGTGGCGTGG GCACTGAGAA GCGCGAAGCT ATCGCGGCTA GTTTCGCGCG CACCGCGCGT GATGCACAC GTGATCGCTT CCGTGGCTCC
CTAGAGCAC CCACCGGAGC GGTACTCTT GCGGCTTCCA TACGCGCGAT GAAAGCGCGG GTGGCGGGA CTACGTGTGG CACTACGCA CCGACGCGAG

GCAGGTCCGA TGTCTATCT CAACGGCGAT GTGAGCTCT TGAAGCATCG TGCACAAAAG GCGCTTCTCT TGCTTCCGA GCGGACGACC CAGGATGGT
CGTCCACGCT ACAAGATAGA GTTGGCGCTA CAGCTGAGGA ACTTCTTACC ACGTGTTTTG GCGGAAGGA ACGAACGCGT CGCTGCTGG GTCCGTACCA

特開昭62-244382 (4)

TGCGCAAGCA CGAAGACATC GATTACTCAG AAAAGGAGTC TTCCAATGAC TAGTAATAAT CTGCCCACGG TCTTGGAAAG CATEGTGCAG GGTCTCTCGG
 ACCGGTTCGT GTTCTCTAG CTAAATGAGTC TTTTCTCTAG AAGGTTACTG ATCATTATTA GACGGGTGCC ACAACCTTTC GTAGCACCTC CCAGCAGCGC

GACACCTGGA GGAATTTCCG GCTCGCATCG CTCACGTGGA TGTGGATGCG CTTCACAAAT CCACCCGCTC TCTGTTGAT TCCCTCAACC AGGGTAGCGG
 CTGTGGACCT CTTTAAGCG CGAGGCTAGC GAGTGACCT ACACCTACGC GAAGGTTTGA GGTGGGCGAG AGACAAGCTA AGGGAGTTGG TCCCATCCCC

AGGGCGCGCT TTCATCATGG AGTCCAAGTC CGCATCGCCT TCTTTGGGAA TGATTCTGTA GCACTACCAAG CCGGGTGAAG TCGCTCGCGT GTACTCTCGC
 TCCCGCGCGA AAGTAGTACC TCACGTTTCA GCGTAGCGGA AGAAACCTT ACTAAGCACT CGTCATGCTC GGGCCACTTT AGCGAGCGCA CATGAGAGCG

TACGCAGCGG CAATTTCCGT GCTGTCCAG CCGGATCGTT TTGCTGGCGA TTACGATCAC CTCGCTACCG TTGGCGCTAC CTCTCATCTT CCGGTGCTGT
 ATGCGTCCCC GTTAAAGCGA CCACAGGCTC GGGCTAGCAA AACCAACCGT AATGCTAGTG GAGCGATGGC AACCGCGATG GAGAGTAGAA GGGCACCACA

GCAAGACTT CATCATTGAT CCGTCCAGG TACGACCGCG GCGTTACTTT GGTGCTGATG CCATCCTGCT CATGCTCTCT GTGCTTGATG ATGAAGAGTA
 CGTTTCTGAA CTAGTAAGTA GGACAGGTCC ATGCTGGCGG CGCAATGAAA CCACCACTAC GTTAGGACGA GTACGAGACA CACGAAGTAC TACTTCTCAT

CGACGCACTC GCTCGCGAGG CTGCGCGTTT TGATCTGCAT ATCTCAGCG AGGTTATTGA TGAGGAGGAA CTCGCGCGCG CCATCAAGCT GGGTGGCAAG
 GCTGCGTGAG CGACGGCTCC GACCGCGAAA ACTACACCTA TAGGAGTGGC TCCAATAACT ACTGCTCTCT CAGCGGGCGG GGTAGTTCCA CCGACCGTTC

ATCTTTGGCG TCAACCAAGC CAACCTGCAT GATCTGTCCA TTGATTTCGA TCGTTACCGT CGCGTGTTCA AGCTCATTCG AGCAGATGCC GTGCTCGTGT
 TAGAAACCGC AGTTGCTGGC GTTGGACCTA CTACACAGGT AACTAAACCT AGCAAGTGCA CGCGACAGGT TCGAGTAAGG TCGTCTACGG CACGAGCACA

CTGAGTCTGG GGTGGCGGAT ACCGAAACCG TCGCGCAGCT AGGTGGGCGC TCCAATGCAT TCGTCTGTTG CTCCAGCTG ACCAGGCGAG AAAACGTCGA
 GACTCAGACC GCACGGCTTA TGGCTTTGGC AGCGGCTCGA TCCACCGCTC AGGTTACCTA AGGAGCAACC GAGGGTCCAG TGGTGGGTCC TTTTGCAGCT

TCTGGCAGCG CGCGAATTGG TCTACGGCGC CAACAAAGTC TCGGAGTCA CCTCACCAG TCGAGCACAA ACCGCTCGCG CAGCGGGTGG GGTCTACGGC
 AGACGCTCGG GCGCTTAACC AGATGCGCGG GTTGTTCAG ACCGCTGAGT GGAGTGCTT ACCTGCTGT TGGCGAGCGC GTGCGCCAGC CCAGATGCGC

GCGCTCATCT TCGAAGAGCG ATCGCCAGCT AATGTTTCAG GTGAACATC GCAAAAAATC ATCGCGCGAG ACCCAAGCT GCGCTACGTC GCGGTACGCG
 CCGGAGTAGA AGCTTCTCGG TAGCGGTGCA TTACAAAGTC CACTTTGTAG CTTTTTTTAC TACCGGCGTC TCGGGTTGGA CGCGATGCAG GCGCAGTGG

GTGCGACCTC CCGGTACAGG GATTGCTTG TCGACGGCAT GTTGGCGGTA CAAATCCAG CCGCACTGCA GGGCAGCGTC GAAGCAGAAA AGGCTATTGAT
 CAGGTGCGAG GCGCATGTTG CTAAACGAAC AGCTGCGGTA GAAGCGGCAT GTTAGGTGCG GGGGTGACGT CCGGTGCGAG CTTCGCTTTT TCGGTAACTA

GCGCGCGGTT CGTGAAGAGG TTGACCGCA GGTCCAGGTC TGGCGCGCGA TCTCGATGTC CAGCCCGTTC GGGGCTGAAG TGGCAGAGGG TGACGTCGAT
 GCGCGCGCAA GCACTTCTCC AACCTGGCGT CCAGGTCCAG ACCGCGCGCT AGAGCTACAG CTCGGGGAAC CCGCGACTTC ACCGTCTCCC ACTGCAGCTA

AAGCTAATTC TTGATGCCCA TGAAGGTGGC ACCGGGGAAG TATTGAGTC GGTACGGTC CCGCGCGCTG TGAAGGCAAA GTCTTTGCTC GCGGAGCGCA
 TTGATTAAAG AACTACGGGT ACTTCCACCG TCGCCCGTTC ATAAGCTGAC CCGATGCCAG GGGCGGCGAC ACTTCGCTTT CAGAAACGAG CCGCTTCCGT

TCTCTCGGGA CAACGCTGGC CAGGCACTCG CTCTGGGCTG CGCAGGTTTA GACATCAACT CTGGCGTGA ATACCGCGCC GGTGCAGGCA GGTGGGGCTG
 AGAGAGGCGT GTTGGGAGCG GTGCTGAGC GACACCGGAC GCGTCCAAAT CTGTACTTGA GACCGCACCT TATGGGCGCG CCACGTCCGT GCACCGCGAC

GGCGGAAAGA TGGCGGCGCG CTGCTGAAAA TTTTGGCGAC CATCTCCACA TTCCATTACT AAGGTTTAA ATAGGATCAT GACTGAAAAA GAAAACTTGG
 CCGCTTTCT ACCCGCGCGG GACGACTTTT AAAAGCGCTG GTAGAGGTGT AAGTAATGA TTTCCAAAT TATCCTAGTA CTGACTTTTT CTTTTGAACC

GCGGCTCCAC GCTGCTACCT GCATACCTCG GTGAATTGG GCGCGAGTTC TCGCGGAAT CCTCTCTGCC TGTCTCGAC CAGCTGAGCA AGGCTTCTGT
 CCGCGAGCTG CGAGATGGA GGTATGAAG CACTTAAGCG GCGGCTCAG CAGCGCTTA GGGAGGACCG ACCAGAGCTG GTCGACCTCT TCGGAGGCA

TGACGGCACC AACAGCCGAG AGTTCCGCGA AGAAGTCGCC GGTACCTCC GCGATTATCT CGGCGCGCCA ACCCGGCTGA CCGAATGCTC CAACCTGCCA
 ACTCGGCTGG TTGTGCGGTC TCAAGGCGCT TCTTACCGCG CCGATGAGG CGCTAATAGA GCGGCGGCT TGGGCGGACT GGTATACGAG GTTGCAGGCT

CTCGCAGCGC AAGGCAAGG CTTTGGCGCG ATCTTCTTCA AGCGCGAAGA CCTCGTCCAC GCGGTTGAC ACAAACTAA CCAGGTGATC GCGCAGGTGC
 GAGCGTCCCG TCCGTTTTC GAAACCGCGC TAGAAGGAGT TCGGCTTCT GAGCAGGTG CCGCGACGTC TGTTTTGATT GGTCCACTAG CCGGTCCAGC

TGCTTGGCAA GCGCATGGG AAAACCGCGA TCATCGGACA CACCGCGCGA GCGCAGCAG GACCGCGCAC CGCTCTCGCA TGTGGCTCA TGGGCTTCCA
 ACGAAGCGTT CCGGTACCGG TTTTGGGCGT AGTAGGCTCT CTGCGCGCT CCGGTCTGTC GGTGGCGGTG GCGAGAGCTT ACACGCGAGT ACCCGAGCT

GTGCGTGTG TACATGGCG CCAAGGAGCT TCGCGCGCAG CAGCGCAAG TCTACCGCAT GCAGTGCAC GCGCGCAAGG TCATCCCGCT GGAATCTGCT
 CACGCAACAG ATGTACCGCG GTTCTCTGCA ACCGCGCGTC GTGCGGTGCG AGATGGCGTA GGTGAGCTG CCGCGCTTCC AGTAGGCGCA CTTAGACCA

特開昭62-244382(5)

TCCGGCACCC TCAAGGACCC CGTGAATGAA GCGCTGCGCG ATTGGACCGG AACCTTCCAC GAGTCCCACT ACCTTCTCGG CACCCGCGCC GCGCCGCAAC
 AGCCCGTGGG ACTTCTCTCG CCACTTACTT CCGGACGCGG TAACCTGCGG TTCCAAGGTC CTCAGGCTGA TGGAAAGACC GTGGCGCGCG CCGGCGCTGG
 CATTCCEAAC CATCGTGGCT GAATTCACCA AGGTGATCTC TGAGGAAGCC AAGGCACAGA TGCTAGAGCC CACCGGCAAG CTTCGGGAGG TTGTGGTGGC
 GTAAGGCTTG GTAGCAGCCA CTAAAGGTGT TCCACTAGAG ACTCCTTCGG TTCCGTGTCT ACCATCTCGC GTGGCGCTTC GAAGGCTGCG AACACCAAGC
 CTGTGTGGGT GGTGGCTCCA AGGCCATCGG CATGTTCGCA GACTTCATTG ACGATGAAGG CGTAGAGCTC GTCGGCGCTG AGCCAGCGCG TGAAGGCTC
 GACACAGCCA CCACCGAGGT TCGGCTAGCC GTACAAGCGT CTCGAAGTAAC TGCTACTTCC GCATCTCGAG CAGCCGCGAC TCGGTCTGGC ACTTCCGGAG
 GACTCCGGCA AGCAGCGCGC AAGCATCACC AACGGTCACA TCGGCATCCT GCACGCGACC CGTTCCTACC TGATGCGCAA CTCGACGCGC CAAGTGGAG
 CTGAGGCGGT TCGTGGCGCG TTGGTAGTGG TTGCCAGTCT AGCCGTAGCA CGTGGCGTGG GCAAGGATGG ACTACGCGTT GAGGCTCGCG GTTCACCTTC
 AGTCTACTC CATCTCGCC GGACTTGATT ACCCAGGCGT CCGCCACAGC ACGCACACCT GCACGCGACC GCGCGCACT ACCTTGGTAT CACCGACGCG
 TCAGGATGAG GTAGAGCGCG CCTCAACTAA TGGGTCCGCA GCGGCTGTGG TGGGTGTGGA CGTGGCGTGG CCGCGCGTGA TGAACCCATA GTGGCTGGCG
 GAAGCCCTCC AAGCATTCGA GTAGCCTCGG CCGCTACGAA GGCATCATCC CGCGCACTGG ATCCTCACA CGGTTTCGGC TACGACTCAA GCGCGCCAA
 CTTCGGGAGG TTCTTAAGGT CATCGGAGCG GCGGATGCTT CCGTAGTAGG CCGGCTGACC TTAGGAGTGT CCGCAAGCGG ATGCTGACTT CCGCGCGTCC
 ACCGCGAAG AGGAAGGCGA GAACCTAAC ATCCTCGTCT CCGTATCCGG CCGTGGCGAC AAGGACGTTG ACCATCGCGC CCGCAGCGTC GAAGAAATC
 TGGCGGCTTC TCCTTCCGGT CTCAATTGG TAGGAGCAGC GCGATAGGCC GGCACGCGTG TTCTTCCAAC TGCTAGCGCG GCGCTGGGAG CTCTTTTAG
 CAGAATGAT CCTGAAGGAC AACCGATGAG CCGTTACGAC GATCTTTTGG GCGAGCGCTC GACAGGCTCA GCGGAGGCGG CCTTTGTTCC CTTCATCATG
 GTCTTGACTA GGACTTCTCG TTGGCTACTC GCGAATGCTG CTAGAAAAAC CGCTCGGAGG CTGTGCCAGT CCGCTCCCGC GGAACCAAGG GAAGTAGTAC
 CTGACCGACC CTTCACGAGA GGAGGCTTTC CAGATCATCT CCACAGCAAT CGAACGTGGC GCAGATGCAC TGAACCTTGG CGTACCTTTC TCGGACCGAG
 GACTCGCTGG GAAGTGGTCT CCTCCGAAAG GTCTAGTAGA GGTGTGTTA GCTTGCACCG CGTCTACGTC ACCTTGAACC GCATGGAAGG AGGCTGGGTC
 TTGCGCATGG CCGCAGCGTC CCGGAATCCG ACCTCGCGCG ACTCGAAGGG GCGCGCACCG TAGACAGCGC ACTCGAGCAG ATCAAGCGCG TCGCGCGAGC
 AACGCTTACC GCGGTGGCAG CCGCTTAGGG TGGAGGCGCG TGAGCTCCCG CCGCGGTGGC ATCTGTGGCG TGAGCTCGTC TAGTTCGCGC AGCGCGCTCG

 CTACCCAGAG GTTCCCATCG GAATGCTCAT CTACGGCAAC GTTCTTTTCA CCGGTGGCTT GGATCGCTTC TACCAAGACT TCGCTGAAGC TGGCGCAGAC
 GATGGGTCTC CAAGGCTAGC CTACGAGTA GATGCGGTTG CAAGCAAGT GCGCACCGAA CTAAGCGAAG ATGGTTCTCA AGCGACTTCC ACCGCGTCTG
 TCCATCTCTC TGGCAGAGCT CCGAGTCCCG GAAGCGCGAC CGTTTTCTGC AGCAGCGCGA GTTCATCCCA TTACATCCG TCGGCGCAAC GCGAGCGAGA
 AGGTAGGAGG AGGCTCTGCA GGGTCAGCGC GTTCCGCGTG GCAAAAGAGG TCGTGGGCTT TAAGTAGGCT AAATGTAGCG AGGCGGCTTG CCGTGGCTCT
 AAACCTTGA GGGTCTCTCC GCGGCATCAA AGGCTTACAT CTACGGCATC TCGCGCGAGC GCGTCACCGG CACCGAAGCT GAATCATCCA CCGAGCGGCT
 TTGGGAGCT CCCACAGAGG CCGCGTAGTT TCCGATGTA GATGCGGTAG AGGCGGCTCG CCGAGTGGCG GTGGCTTGA CTTAGTGGGT GGTGCGCGGA
 GTCCGAGTG GTGCACACA TCAAGAAATT TGATGGCGCA CCCATCTCTT TCGGCTTCGG CGTCTCATCC CCTCAGCAGC TGGCAGACCG GATTGCAGCG
 CAGGCGTCA CACCTGTGTG AGTTCTTTAA ACTACCGCGT GGGTAGGAGA ACCGGAAGCC GTGCAGTAGG GGAGTCTGCG ACCGTCTGCG CTAAGCTCGC
 GGTGCTTCCG GTGCGATCAC GGGTTCGCGG ATCACCAGCA TCATTGCTTC CCACTGCGAA GGTGAGCACC CGAACCCCTC CACCATTCGA GATATGGAGC
 CCACGAAGGC CAGGCTAGTG CCCAAGCGCG TAGTGGTTCT AGTAACGAAG GGTGACGCTT CCACTCGTGG GCTTGGGCGG GTGTAAGCT CTATACCTGC
 GTTTGAAGAA GGATCTCACT GAGTTCATCT CTGCGACTGA AGCGAGCGAC CAAGAAGGTT TAGGCTTTA ATGTGGCAA TGTTTACCTT GAAACATTCT
 CAACCTTCTT CTAGAGTGA CTCAGTAGA GACGCTGACT TCGTCTGCTG GTTCTTCCAA ATCCGGAAT TTACACCGTT ACAGGTGCA CTTTGTAAGA
 GAGAGATGT AGAATACATCA AAGAAGCCAC CTCCTAGCTC TCGGCGTGGG AGCGCGCTTC TTGTTTGGG GTTTAGGAAA TCTCAGGCTT TTGGAGATCT
 CTCTTTACA TCTTTCTAGT TTCTTGGGTG GAGGATCGAG AGCCCGAGCC TCGGCGGAAG AAACAAACGC CAATCTCTT AGAGTCCCAA AACCTCTAGA
 TAGCTTCGAG CCGCTGGGGT AGGAGCGCGC GCGGAGGAG CAATCTTAGG GTAGGTCCGA GCGGAGCGG TTGGAGTGGG ATCAGCTTCC GCGTTCGCGA
 ATCAAGCTC GCGCAGCGCA TCTGCGGGG CCGCTTCTC GTTAGAATCC CATCCAGCT CCGGCTCGCG AACCTCAGCG TAGTGAAGG CCGAAGAGGT
 CCGGCTTACC GTTGGGAGCT GCATCC
 GCGCGGATGC CAACCTTGA CCTAGG

2) 特許請求の範囲第1項記載の各種領域よりなる群から選ばれる1以上よりなるDNA。

3) DNA が人工的に合成されたDNA 又は微生物に由来するDNA である特許請求の範囲第1項又は第2項記載のDNA。

4) 微生物がコリネ型細菌である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

5) 微生物がブレヴィバクテリウム属に属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

6) 微生物がブレヴィバクテリウム・ラクトフェルメンタムに属する微生物である特許請求の範囲第3項記載のDNA。

7) DNA が1部置換、変異又は削除されたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第6項記載のDNA。

8) DNA がプラスミド又はファージ由来のベクターに組込まれたDNA である特許請求の範囲第1項ないし第7項記載のDNA。

9) 特許請求の範囲第2およびまたは8項記載のDNA を用いるL-トリプトファンの製造法。

10) 下記第2式ないし第7式のアミノ酸配列をもつペプチド又は蛋白(第2式ないし第7式中

A アラニン、C システイン、D アスパラギン酸、E グルタミン酸、F フェニルアラニン、G グリシン、H ヒスチジン、I イソロイシン、K リジン、L ロイシン、M メチオニン、N アスパラギン、P プロリン、Q グルタミン、R アルギニン、S セリン、T スレオニン、V バリン、W トリアトファン、Y チロシンを示す。

なお、第2式はトリプE酵素、第3式はトリプG酵素、第4式はトリプD酵素、第5式はトリプC酵素、第6式はトリプB酵素、第7式はトリプA酵素のアミノ酸配列を示す。)

第 2 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
HSTNPHVPSL DRYBEDASA LFAHLGGTA DDAALLESAD ITTKNGICSL AVLKSSVRIT CTGNTVVTP LTDSCRAVVA RLTOQLGOYN TAENTFSPA

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
SDAVDERERL TAPSTIEVLR KLFESGYS DLSPLLMGCF AFDLETPT LPAYEESVHT YPDYQPVLA IVDINHDDQ TAXLTGVSNA PGELEAELNK

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
LSLLTDAALP ATEBAYOTTP HOGDTLRVA DIPDAQFRTO IMELKENIYN GDIYQVVPAR TFTAPCPDAF AATLQLRATN PSPYHFYIRC LNEGRSYELF

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
CASPEENLKF TAANRELQLY PIACRPRCL NPDGSINDEL DIRNELDHT DAKIADDTM LVDLARNDLA RVSVPASRRV ADLLOVDVRS RVHNLVSRVT

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
ATLDPELDAL DAYRACHNMG TLTGAPKLR HELLRGVEKR RRGSYGGAVG YLRGNGDNDH CIVIRSAFVO DGVAAVQAGA GVVROSNPOS EADETLKAY

510     520
AVLNAIALAA CSTLEVR

```

第 3 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTHVVLIDNH DSFYVNLVDA FAVAGYKCTV FRNTVPVETI LAAMPDLICL SPGPGYPADA GNMHALIERT LGQIPLLGIC LGYQALIEYH GGNVEPCGPV
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 BCTTDNMILT DAGVQSPVFA GLATDVEPDH PEVPGRKVPI GRVHSLGCVV APDGIESLCT CSSEIGDVIH AARTTDGKAJ GLQFHPESVL SPTGPIILSR
 210
 CVEOLLAN*

第 4 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTSPATLKVL NAYLDNPTPT LEBATEVPTP LTVGEYDDVH IAALLATIRT RGEQFADIAG AAXAFLAAR PFPITGAGLL DSAGTGGDGA NTINITTGAS
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 LIAASCGVKL AKHGHRVSYS KSGSADVLEA LNIPLGLDGD RAVKWFESM FTPLFTPAYN PAIAHVQPVH QALKPTIFN TLGPLLSPAR PERQIMGVN
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 ANHCOLIAEV FRELCRTRAL VVHCAGTDEI AVHGTTLVWE LKEDCTIEDY TIEPEDLGLG RYTLEDLVGG LGTENAEAMR ATFACTGPDA HRDALAASAG
 310 320 330 340 350
 AMPYLNQDGD SLKDCQXAL SLLADATTOA WLAKHEEIDY SEXESSND*

第 5 式

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
 MTSNNLPITVL ESIVEGRRCR LEEIRARIAH VQYDALPKST RSLFDSLNGG RGGARFIMEC KSASPSLGMH RENYQPGELA RVYSRYAAAI SVLCEPDRFG
 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200
 GOYDHLATVG ATSHLPVLCK DFIIDPVQVR PARYFGADAI LLHLSVLDD EYDALAAEAA RFDLDILTEV IDEEEVARAI KLGAKIFGVN HRMLHLSID
 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 LQSRRLSKL IPADAVLYSE SCVROTETVR QLCGDSNAFL VGSQLTSEEN VOLAARELVY GPNKVCGLTS PSAAQATARAA GAVYGGGLIFE EASPRNVSR
 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 TSQXIIAAEP NLRVVAVSRR TSGYKOLLVD GIFAVQIDAP LOGSVAEAKA LIAAVREEVG PQVQVHRAIS MSSPLGAEVA EGDVQXLILD ANEGGSGEVF
 410 420 430 440 450 460 470 480
 DNATVPAAVK AKSLLAGGIS PDNAAQALAV GCAGLDINSG VEYPACACTW GWGECRRRAA ENFRDLNIP LLKV -

第 6 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MTEKENLGGG TLLPAYFGEF GQDFVAESLL PALDOLERAF VDATNSPEPR EELGGYLRDY LGRPTPLTEC SNLPLAGECK GFARIFLKBE DLVHGGAHKT

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
HOVICOVLLA KRHGKTRIIA ETCAGQHGTG TALACALMGL ECVVYHCAKD VARQOPHVYR HQLBGAKVIP VESGSGTLKD AVNEALROWT ATFHESHYLL

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
GTRAGPHPPF TIVREFHKVI SEEAKAQNLE RTGKLPDVVV ACVGGGSNAI GNFADFIDDE GVELVGAEPG GEGLDGSKNG ATITNGQIGI LNCSTRSYLMR

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
NSDCQVEESY SISAGLDYPC VGHSTHTCTP PARTTLVSPT PXPSKHSSSL ARYEGIIPT CILTRVRLRL KRAKTAEEEG QNLTILVSLG CRGDKVDVHR

410     420
ACTLEENPEL ILKDNR

```

第 7 式

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
MSRYDDLFGD ASTRSGEGAF VPFIMLSDPS PEEAFQIIST AIERGADALE LGVPPSDPVA DGPTVAESNL RALDGGATVD SALEQIKRVR AATPEVPICH

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
LIYGNVPFTR GLDRFYDEFA EAGADSILLP DVPVREGAPF SAAAGIDPIY IAPANASEKT LEGVSAASKG YIYAISSRGV TCTERESSTD GLSAVVONIK

210     220     230     240     250     260     270     280     290
KFDGAPILLG FGISSPQHYA DATAAGASGA ITGSAITKII ASHCEGEHPN PSTIRDMDGL KKDLTEFISA TEGSDDEGLG L

```

11) アミノ酸配列が1部置換、変異、又は削除されたアミノ酸配列である特許請求の範囲第10項記載のペプチド又は蛋白。

12) 特許請求の範囲第10項ないし第11項記載のペプチド又は蛋白をコードするDNA。

13) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のプロモーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

14) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のオペレーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

15) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のアテニュエーターおよび、またはリーダーペプチド領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

16) 特許請求の範囲第1項及び又は第7項記載のターミネーター領域の配列を有するDNAを用いる遺伝子発現法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、組換えDNA法によるL-トリプトフ

ァンの生産菌の分子育種や生理活性ペプチドの生産に応用可能なコリネ型細菌の、さらに限定すればブレビバクテリウムの、トリプトファンオペロンを含むDNA配列とそこにコードされるアミノ酸配列に関する。

本発明にいうコリネ型細菌 (Coryneform bacteria) は、バージース・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー (Bergeys Manual of Determinative Bacteriology) 第8版 599頁 (1974) に定義されている一群の微生物であり、好気性、グラム陽性、非抗酸性、胞子形成能を有しない桿菌である。このようなコリネ型細菌のうち特に以下に述べるようなコリネ型グルタミン酸生産性細菌が本発明においては、最も好ましいものである。

コリネ型グルタミン酸生産性細菌の野性株の例としては次のようなものがあげられる。

ブレビバクテリウム・ディバリカタム

ATCC 14020

ブレバクテリウム・サッカロリチウム	
	ATCC 14066
ブレバクテリウム・インマリオフィウム	
	ATCC 14068
ブレバクテリウム・ラクトフェルメントム	
	ATCC 13869
ブレバクテリウム・ロゼウム	ATCC 13825
ブレバクテリウム・フラバム	ATCC 13826
ブレバクテリウム・チオゲニタリス	
	ATCC 19240
コリネバクテリウム・アセトアシドフィルム	
	ATCC 13870
コリネバクテリウム・アセトグルタミカム	
	ATCC 15806
コリネバクテリウム・カルナエ	ATCC 15991
コリネバクテリウム・グルタミカム	
	ATCC 13032, 13060
コリネバクテリウム・リリウム	ATCC 15990
コリネバクテリウム・メラセコーラ	
	ATCC 17965

し（例えばH.Saito and K.Miura Biochem.Biophys. Acta 72,619(1963)の方法が使用できる。）、これを適当な制限酵素で切断する。ついで微生物細胞内で複製し得て、かつプロモーター活性をもつベクターに接続し、得られた組換えDNAを用いて、コリネ型細菌もしくはその他の微生物で、トリプトファン生合成系の構造遺伝子が変異を受け、酵素が活性を失ない、そのためにトリプトファン要求性を示すようになっている変異株を形質転換し、該酵素活性が回復、上昇し、トリプトファン要求性が消失する菌株を採取し、これより該構造遺伝子をもつ複合プラスミドを分離できる。

このような方法でも、幸運にしてオペロン全域を単離できる場合もあるが、もしもオペロン全域を単離（クローン化）できなかった場合は、上述の方法により分離した各構造遺伝子の一部もしくは全部をアイソトープ等でラベルしそれらをプローブにして、プラスミドもしくはファージベクターを用いて作成したコリネ型細菌の染色体遺伝子のジーンバンクからコロニーハイブリダイゼイシ

マイクロバクテリウム・アンモニアフィラム	
	ATCC 15354

本発明のコリネ型グルタミン酸生産性細菌には上記のようなグルタミン酸生産性を有する野性株のほかにグルタミン酸生産性を有するまたはグルタミン酸生産性を失った変異株も含まれる。

ここでいうトリプトファンオペロンとは、プロモーター、およびアテニュエーター、さらにリーダーペプチドをコードする領域（trpL）、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子（trpE, trpG）、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子（trpD）、N-(5'-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子（trpC）、トリプトファンシンターゼ遺伝子（trpB, trpA）の各構造遺伝子が隣接して配置され、一つの転写単位として機能しているものをいう。

各構造遺伝子を単離する方法は、コリネ型細菌のトリプトファンオペロン、或いは、各構造遺伝子を有している株より、まず染色体遺伝子を抽出

ョンにより、単離可能である。

染色体遺伝子を切断するには、切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、巾広い種類の制限酵素が使用できる。

本発明のうちトリプトファンオペロンもしくはその1部をトリプトファンの生産に使用する場合に用いるベクターは、コリネ型細菌細胞内もしくはE.coli、B.subtilisにおいて増殖し得るものであればどのようなものでも良い。具体的に例示すれば、以下のものがあげられる。

- | | |
|--------------|-------------------|
| (1) pAM 330 | 特開昭58-67699参照 |
| (2) pAM 1519 | 特開昭58-77895参照 |
| (3) pAJ 655 | 特開昭58-192900 参照 |
| (4) pAJ 611 | 同上 |
| (5) pAJ 1844 | 同上 |
| (6) pCG 1 | 特開昭57-134500 参照 |
| (7) pCG 2 | 特開昭58-35197参照 |
| (8) pCG 4 | 特開昭57-183799 参照 |
| (9) pCG 11 | 同上 |
| (10) pCC 1 | 特開 (Nautin/Ajico) |

- (11) pBL 100 特開 ()
 (12) pBR 322
 (13) pC 194

ベクターDNAの開裂は、当該DNAを一箇所て切断する制限酵素を用いて切断するか、複数部位を切断する制限酵素を用いて部分的に切断することにより行う。

ベクターDNAは、染色体遺伝子を切断した際に用いられた制限酵素により切断され、または染色体DNA切断フラグメント及び切断されたベクターDNAのそれぞれの両端に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを接続せしめて、ついでプラスミドベクターと染色体DNAフラグメントとのライゲーション反応に付される。

このようにして得られた、染色体DNAとベクターとの組換えDNAをコリネ型細菌に属する受容菌へ導入するには、エシェリヒア・コリK-12について報告されている様な(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159(1970)) 受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方

法、またはパチルス・ズブチリスについて報告されている様に(Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153(1977)) 細胞がDNAを取り込み得る様になる増殖段階(いわゆるコンピテントセル)に導入する方法により可能である。あるいは、パチルス・ズブチリス、放線菌類および酵母について知られている様に(Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111(1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, D.A., Nature, 274, 398(1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Frink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978))、DNA受容菌を、プラスミドDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストにして組換えDNA受容菌に導入することも可能である。

プロトプラスト法では上記のパチルス・ズブチリスにおいて使用されている方法でも充分高い頻度を得るとができるし、特開昭57-183799に記載されたコリネバクテリウム属またはプレバクテリウム属のプロトプラストにポリエチレン

グリコールまたはポリビニルアルコールと二価金属イオンとの存在下にDNAをとり込ませる方法も当然利用できる。ポリエチレングリコールまたはポリビニルアルコールの代りに、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、フィコール、ブルロニックF68(セルバ社)などの添加によってDNAのとり込みを促進させる方法でも同等の結果が得られる。

クローニングしたトリプトファンオペロン、或いは各構造遺伝子を用いてトリプトファン生産菌の分子育種を行うには、遺伝子のクローニングの際に用いたトリプトファン要求性の変異株を宿主として形質転換した株を用いることができるが、以下に示すような宿主を用いればよりトリプトファンの生産性が高い菌株が得られることがある。

プレバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, H. Sato, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 36, 2315(1972))、プレバクテリウム属のフェニルアラニンを要求し、m-フ

ルオロフェニルアラニン、5-フルオロトリプトファンに耐性を有する変異株(I. Shio, S. Sugimoto, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 627(1975))、プレバクテリウム属のチロシンを要求し、5-フルオロトリプトファン、アゼセリンに耐性を有する変異株、コリネバクテリウム属のフェニルアラニン、チロシンを要求し、5-メチルトリプトファン、4-メチルトリプトファン、6-フルオロトリプトファン、トリプトファンヒドロキサメート、p-フルオロフェニルアラニン、チロシンヒドロキサメート、フェニルアラニンヒドロキサメートに耐性を有する変異株(H. Hagino, H. Nakagawa., Agric. Biol. Chem., 39, 345(1975))等がある。

このようにして得られたトリプトファン生産能を有するコリネ型細菌を培養してトリプトファンを生成蓄積せしめる方法は、従来コリネ型細菌によるトリプトファンの製造のために使用されていた方法と特に大きく違う点はない。即ち、培地としては、炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要

に應じアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常のものである。炭素源としては、グルコース、シュクロース、ラクトース等及びこれらを含有する澱粉加水分解液、ホエイ、糖蜜等が用いられる。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。

培養は好氣的条件下で培地のpH及び温度を適宜調節しつつ、実質的にトリプトファン¹の生産濃度が停止するまで行なわれる。

トリプトファン生産菌の分子育種に加え、さらに、本発明によって得られるもう一つの大きな利点は、プレビバクテリウムのトリプトファンオペロンのプロモーターがE.coliのトリプトファンオペロンのプロモーターと同等或いはそれ以上の強い活性を有し、かつその末尾の構造から予測される様に強いターミネーターを有しており、またコリネホルム型細菌内においてトリプトファンにより発現調節を受けるオペレーターを有していることである。E.coliでの異種遺伝子例えば、インク

ーフエロン、成長ホルモン、インターロイキン、神経成長因子、或いはその他生理活性ポリペプチド又は酵素等の発現又は異種蛋白の過剰生産においては、E.coliトリプトファンプロモーター、オペレーター、及びターミネーターが常用されている。即ち、本発明によって得られたトリプトファンオペロンは、コリネホルム型細菌におけるトリプトファン生産菌の分子育種を勿論促進するが、さらにE.coli系、或いは他のコリネホルム型細菌における遺伝子の強力な発現、及びその調節を行い得るプロモーター、オペレーター、及び、ターミネーターを有するものであり、このDNA配列を用いて上記の異種遺伝子を強力に発現し、過剰生産することが可能である。

また、本発明のDNA配列のうち、遺伝子の発現に関与する部分であるプロモーター領域、オペレーター領域、アテニューエーター領域ならびにリボソーム結合領域の塩基配列、及びターミネーター領域の塩基配列を各々単独で、或いはいずれかを組合わせた形で（取り出して）使用する場合、あ

るいは、各酵素の構造遺伝子の塩基配列について、コードされたアミノ酸配列が異ならないように置換して得たDNA配列も、更にいえば、本発明のDNA配列の任意の部分の塩基を他のものと置換したり、新たに塩基を挿入したり、又は削除した場合、或いは、塩基配列の一部を転位させた場合に得られる誘導体およびそれにコードされるアミノ酸配列の蛋白も、いずれも遺伝子の発現及びトリプトファン生産菌の分子育種に良好な結果を与えるものと想定され、主要部分を本発明に依存する技術として本発明の範囲に入るものである。

以下、具体例によって本発明のDNA配列を含むプレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの取得方法、及び本発明のDNAの塩基配列の決定とアミノ酸配列の決定、並びに本発明のDNAを用いて形質転換して得られるコリネ型細菌によるトリプトファンの生産およびプロモーター、オペレーターについて説明する。

実施例 1.

アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼ β サブユニット遺伝子のクローニング

1-1 プレビバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンを含む染色体DNAの調製

プレビバクテリウム・ラクトフェルメンタム AJ11225 (PERM-P4370) を 1 ml の CHG 培地（ペプトン 1 g / ml、酵母エキス 1 g / ml、グルコース 0.5 g / ml、及び NaCl 0.5 g / ml を含み、pH 7.2 に調整したもの）に接種し、30℃で約3時間振盪培養を行ない、対数増殖期の菌体を集めた。

この菌体をリゾチーム・SDS で溶菌させたのち、通常のフェノール処理法により、染色体DNAを抽出精製し、最終的に 3.5 μ g の DNA を得た。

1-2 ベクターDNAの調製

ベクターとして pAJ1844（分子重 5.4 メガダルトン）を用い、そのDNAを次の様にして調製した。

まずpAJ1844をプラスミドとして保有するプレバクテリウム・ラクトフェルメンタムAJ12037を100 mlのCMG培地に接種し、30℃で対数増殖期後期まで培養したのち、リゾチームSDS処理により溶菌させ、30,000×g、30分の超遠心により上清を得た。フェノール処理ののち、2容のエタノールを加えてDNAを沈澱回収した。これを少量のTEM緩衝液(20 mMトリス塩酸塩、20 mM NaCl、1 mM EDTA (pH 8.0))に溶解後、塩化セシウム-エチジウムブロミド密度勾配平衡遠心によりプラスミド画分を分離し、最終的にpAJ1844プラスミドDNA約200 μgを得た。

1-3 染色体DNA断片のベクターへの挿入

1-1で得た染色体DNA 10 μgと1-2で得たプラスミドDNA 5 μgとを制限エンドヌクレアーゼPst Iでそれぞれを37℃に1時間保持し、切断した。65℃にて10分間加熱した後、両反応液を混合し、ATP及びジチオスレイトール存在下、T₄ファージ由来のDNAリガーゼによって10℃にて24時間保持しDNA鎖を連結せしめた。ついで

を集め、菌体を0.5 Mシュクロース、20 mMマレーン酸、20 mM塩化マグネシウム、3.5 %ペナッセイブロス(Difco)からなるSHMP培地(pH 6.5) 0.5 mlで洗浄した。次いで10 mg/mlのリゾチームを含むSHMP培地に懸濁し30℃で20時間プロトプラスト化を図った。6000×g、10分間遠心分離後、プロトプラストをSHMPで洗浄し0.5 mlのSHMPに再度懸濁した。この様にして得られたプロトプラストと1-3で調製したDNA 10 μgを5 mM EDTA存在下で混合し、ポリエチレングリコールを最終濃度が30 %になる様に添加した後、DNAをプロトプラストに取り込ませるために室温に2分間放置した。このプロトプラストをSHMP培地1 mlで洗浄後、SHMP培地1 mlに再懸濁し、形質発現のため、30℃で2時間培養した。この培養液をpH 7.0のプロトプラスト再生培地上に塗布した。プロトプラスト再生培地は蒸留水1 mlあたりトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 12 g、KCl 0.5 g、グルコース 10 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 8.1 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.2 g、

反応液を、65℃にて5分間加熱し、反応液に2倍容のエタノールを加えて連結されたDNAの沈澱を採取した。

1-4 アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、及びトリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子のクローニング

プレバクテリウムラクトフェルメンタムのアンスラニル酸シンターゼ欠損株AS60、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ欠損株№38、トリプトファンシンターゼβサブユニット欠損株№30(いずれもAJ12125を親株とし、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより変異処理することにより分離した)をDNA受容菌として用いた。

形質転換の方法としては、プロトプラストトランスフォーメーション法を用いた。まず、菌株を5 mlのCMG液体培地で対数増殖期の初期まで培養し、ペニシリンGを0.6 ユニット/ml添加後、さらに1.5時間振盪培養し、遠心分離により菌体

ベプトン4 g、粉末酵母エキス4 g、カザミノ酸(Difco社) 1 g、 K_2HPO_4 0.2 g、コハク酸ナトリウム 13.5 g、寒天8 g及びクロラムフェニコール 3 μg/mlを含む。

30℃で2週間培養後、各受容菌について各々約25000個のクロラムフェニコール耐性コロニーが出現してきたのでこれを最少培地(2 %グルコース、1 %硫酸アンモニウム、0.3 %尿素、0.1 %りん酸二水素カリウム、0.04 %硫酸マグネシウム7水塩、2 ppm鉄イオン、2 ppmマンガンイオン、200 μg/lサイアミン塩酸塩、50 μg/lビオチン、カザミノ酸(Difco) 3 g/l、クロラムフェニコール 10 μg/ml、pH 7.0、寒天 1.8 %)にレプリカし、クロラムフェニコール耐性でかつトリプトファン要求性の消失した株をAS60を用いた区分から2株、№38を用いた区分から1株、№30を用いた区分から1株得た。

上記5株からプラスミドを抽出したところ、いずれのプラスミドもベクタープラスミドpAJ1844よりも明らかに大きく、AS60を用いた区分から得

た組換えプラスミドをptrpE36、ptrpE4、№38を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpD3851、№30を用いた区分から得た組換えプラスミドをptrpB301と名付けた。

1-5 再形質転換

1-4 で得た組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301上に各々アンスラニル酸シンターゼ遺伝子、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子、トリプトファンシンターゼβサブユニット遺伝子が存在することを確認するため、ptrpE36、ptrpE4をAS60に、ptrpD3851を№38に、ptrpB301を№30に再度形質転換した。

生じたコロラムフェニルコール耐性コロニーのうちそれぞれ10個を釣り上げ、トリプトファン要求性を調べた。その結果、いずれもが要求性を消失しており、ptrpE36、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼ遺伝子が、ptrpD3851には、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子が、ptrpB301にはトリプトファンシンター

ゼβサブユニット遺伝子が存在することが明らかになった。ただしptrpE4の形質転換株では栄養要求性の消失の程度、及び最少培地上でのアンスラニル酸の蓄積がptrpE36の形質転換株に比較して悪く、ptrpE4にはアンスラニル酸シンターゼの遺伝子の一部が欠けているのではないかと示唆された。

1-6 組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の作製

実施例1-2 で用いた方法により組換えプラスミドptrpE36、ptrpE4、ptrpD3851、ptrpB301を調製し、常法に従い各種制限酵素で切断し挿入DNA断片の制限酵素地図を作製した(第1図)。

実施例2.

ブレバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロン全域のクローニング
ブレバクテリウムラクトフェルメンタム
AJ11225から自然突然変異により分離した5-フルオロトリプトファン抵抗性の№1041(トリプトファンによるアンスラニル酸シンターゼのフィー

ドバック阻害が解除した株)から実施例1で示した方法により染色体DNAを調製し、制限酵素BamHI 或いはSalI、又はXhoIで完全に切断し、E.coliのベクターpUC18(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))の各制限酵素切断部位に連結し、E.coli JM109(Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119(1985))を形質転換し、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactoside), IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)、アンピシリンを含む1寒天培地にプレーティングした。37℃で24時間培養後出現した白色コロニー合計約1500コロニーをニトロセルロースフィルター上に釣り上げた。実施例1で得たアンスラニル酸シンターゼ遺伝子(trpE)を有するptrpE36の1.2kbのPstI挿入断片をプローブにして、コロニーハイブリダイゼーション(Grunstein, M., Wallis, J.: Methods in Enzymology, 68, 379, Academic Press Inc., New York(1979))を行ない制限酵素BamHIを用いた区分から1つ、制限酵素SalIを使用した区分から1つのポジティブクロー

ンを得た。BamHI区分から得た組換えプラスミドをptrpE97、SalI区分から得たプラスミドをptrpE42と名付け、実施例1で示した方法に挿入DNA断片の制限酵素切断地図を作成した(第1図)。その結果、ptrpE97はptrpE36、ptrpD3851、ptrpB301の挿入PstI断片と同じ制限酵素地図を有するPstI断片を有しており、ptrpE42はptrpE36のPstI断片及びptrpD3851のPstI断片の一部と同じ制限酵素地図を有していることが明らかとなった。又、ptrpE97とptrpE42は共通のBamHI-SalI断片を有していた。

実施例3

N-(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(trpC)のサブクローニング及びトリプトファンシンターゼのサブユニット遺伝子(trpA)のサブクローニング

第1図の組換えプラスミドの挿入DNA断片の制限酵素地図の比較からtrpD遺伝子とtrpB遺伝子の間にtrpC遺伝子が、trpB遺伝子の下流にtrpA遺伝

子が存在するのではないかと考えられていた。そこで各遺伝子の存在を確認するため以下の実験を行った。

3-1 trpC遺伝子のサブクローニング

組換えプラスミド p33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置した。或いは第1図の約2.6 kb. の SstI-Hind III断片を分画し SstI, Hind III で切断した pUC18 (Messing, J., et al., Gene, 33, 103-119, 1985) に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5889 (trpC60, pyrF287, hisG1, lacZ53, rpsL8, λ^-) を形質転換した。その結果、SstI-EcoRI断片、或いは SstI-Hind III断片を有する組換えプラスミドは、E. coli の要求性を消失させた。

3-2 trpA遺伝子の存在の確認

組換えプラスミド p

列はブレヴィバクテリウムラクトフェルメンタムのトリプトファンオペロンの発現に必要なRNAポリメラーゼの結合部位 (trpプロモーター)、リボゾームの結合部位、アンスラニル酸シンターゼ遺伝子 (trpE, trpG)、ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子 (trpD)、N-(5-ホスホリボシル) アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子 (trpC)、トリプトファンシンターゼ遺伝子 (trpB, trpA) に対応するDNA配列、及び停止配列 (ターミネーター) を含むことが判明した。

又、プロモーターと trpE 構造遺伝子との間は、転写レベルでの発現調節機構であるリプレッションに因与するオペレーター領域及び翻訳レベルでの発現調節機構アテニュエーションに因与するリーダーペプチド (trpL) をコードする領域とアテニュエーター様構造が存在する領域が存在すると推定された (第3図)。ターミネーターの構造は第6図に示した。

約2.4 kb. の NruI-BamHI断片を分画し、SmaI, BamHI で切断した pUC18 に連結し、lac プロモーターからの転写が可能になるように配置し、E. coli CGSC No. 5644 (trpA33, rha-7, λ^-) を形質転換した。その結果、NruI-BamHI断片を有する組換えプラスミドを保持する形質転換株では、トリプトファン要求性の消失が認められた。
実施例4.

トリプトファンオペロンの塩基配列の決定

実施例1で得られた p19, 269 (1982)) を用いる dideoxy chain termination 法 (Sanger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 (1977)) により第2図に示した塩基配列決定のための戦略図によって、トリプトファンオペロン全塩基配列を決定した。その結果、次に示すDNA塩基配列が得られ、この塩基配

実施例5.

プロモーターの単離と活性確認

塩基配列の決定の結果、推定されたトリプトファンオペロンのプロモーターを単離し、その機能を確認するため、第4図に示したように、p27, 151 (1984)) にサブクローンした。得られた組換えプラスミド p

さらに、pAN330 由来のトリメトプリム耐性のベクター、pAJ226 の PstI 切断部位に PstI で切断した上記組換えプラスミド p

第1表 カザミノ酸を添加した最少増地におけるテトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性

	テトラサイクリン耐性度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		トリプトファン添加 (mg/ml)
	トリプトファン無添加	トリプトファン添加	
ptrpP01 in <i>E. coli</i>	20	20	20
ptrpP02 in <i>Brevibacterium lactofermentus</i>	25	5	5
ptrpP03 in <i>E. coli</i>	20	20	20
ptrpP04 in <i>E. coli</i>	20	20	20
クロラムフェニコール耐性度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
ptrpP05 in <i>E. coli</i>	500 <	600 <	600 <
ptrpP06 in <i>E. coli</i>	600 <	600 <	600 <
pEB003TR* in <i>E. coli</i>	400	200	200

*pEB003TRは*E. coli*のトリプトファンプロモーターを有している

スミドpAJ234を用いて、 L -トリプトファン生産について検討した。

pAJ234を用い、 m -フルオロフェニルアラニン及び5-フルオロトリプトファン耐性株¹⁻⁴プレバクテリウム・ラクトフェルメンタムM247を母で述べた方法により形質転換し、クロラムフェニコール耐性を指標として形質転換株を選択した。かくして得られたAJ12195(FERM-P8014)を培養し、トリプトファン生産能を調べたところ第2表に示す結果を得た。

培養はトリプトファン生産培地(グルコース130g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 25g、フマル酸12g、酢酸3g、 KH_2PO_4 1g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg、 $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g、 d -ビオチン50 μg 、サイアミン塩酸塩2000 μg 、メチオニン400mg、チロシン650mg、大豆蛋白加水分解液「味液」50g、 CaCO_3 50gを水1ℓに含む、 pH 6.5) 20 μg を500 μg の坂口フラスコに入れたものに被検菌株を植えつけ、30℃にて72時間、振盪下に行なった。培養後、遠心上清中の L -

次にプロモーター領域をさらに限定するため、*EcoRI*-*HindIII*断片を AluI 或いは、*HaeIII*で切断し、各断片をpKK¹⁷⁵⁻⁶上にサブクローン化した(第5図)。その結果 AluI -*HindIII*断片(51bp)及び*HaeIII*-*HindIII*(135bp)上にプロモーターが存在することが明らかとなった。同様の結果を*E. coli*のプロモータープロベクターpKK232-8(Ap耐性、クロラムフェニコール感受性)を用いて得ており、 AluI -*HindIII*断片(51bp)上にプロモーターが存在することを確認した。

実施例6.

ホスホリボシルアンスラニル酸トランスフェラーゼ遺伝子(*trpD*)、 N -(5-ホスホリボシル)アンスラニル酸イソメラーゼ-インドール-3-グリセロールリン酸シンターゼ遺伝子(*trpC*)、トリプトファンシンターゼ遺伝子(*trpB*, *trpA*)の増幅によるトリプトファン生産菌の育種。

クローニングしたプレバクテリウムラクトフェルメンタムトリプトファンオペロンのうち*trpD*, *trpC*, *trpB*, *trpA*の4遺伝子を有する組換えプラ

リプトファンをロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8042を定量菌株として用いるバイオアッセイ法によって求めた。

第2表 形質転換株の L -トリプトファン蓄積量

菌株	L -トリプトファン蓄積量
M 247	0.16 g/dl
FERM P-8014 AJ 12195 (M 247/pAJ 234)	0.52 g/dl

尚、M 247を得るためには寄託されたAJ 12195より宿主細胞を壊ことなく宿主細胞中の複合プラスミドを除去することが可能である。即ち、プラスミドは宿主より自然に失われることもあるし、「除去」操作によって除くこともできる(Bact. Rev., 36, p361-405(1972))。他の除去操作の例は以下の通りである。AJ 12195をCMG液体培地に接種し、37℃で一晩培養(高温処理)後、培養液を適当に希釈し、クロラムフェニコールを含有し又は含有しないCMG寒天培地に塗布し、30℃で1~3日間培養する。かくしてクラロム

第 3 図

```

trpL
MetAsn
-35  TACACAGAACCCCAAAATGATTAAATAGACAAAGCTTCCACATATGTGATAAAGTCCCATTTTGTGAAT
-10
AsnSerCysLeuSerGlnSerThrGlnTrpTrpTrpTrpArgAlaAsn...
AACTCTGTCTCAGTCAAAGCACCAGTGGTGGTGGCGCTAACTAAGCGAGCCTGACACCTCAAGTTGTTT
TCACTTTGATGAATTTTTTAAGGCTCGTACTTCGTTCGACGAGAAGCGGGGCTTTTGTGGTTTTTAGCCAC
AACCGGCAAGCCCTGGATCGAATGAAGCTCGACGAGAGTAATTATTGATGTTTCCACAAAGGCTTCAGCCC
MetSerThrAsn
CACAAATGATTTCCACGGTAGGTGGCCCCATGAGCAGCAAT
trpE

```

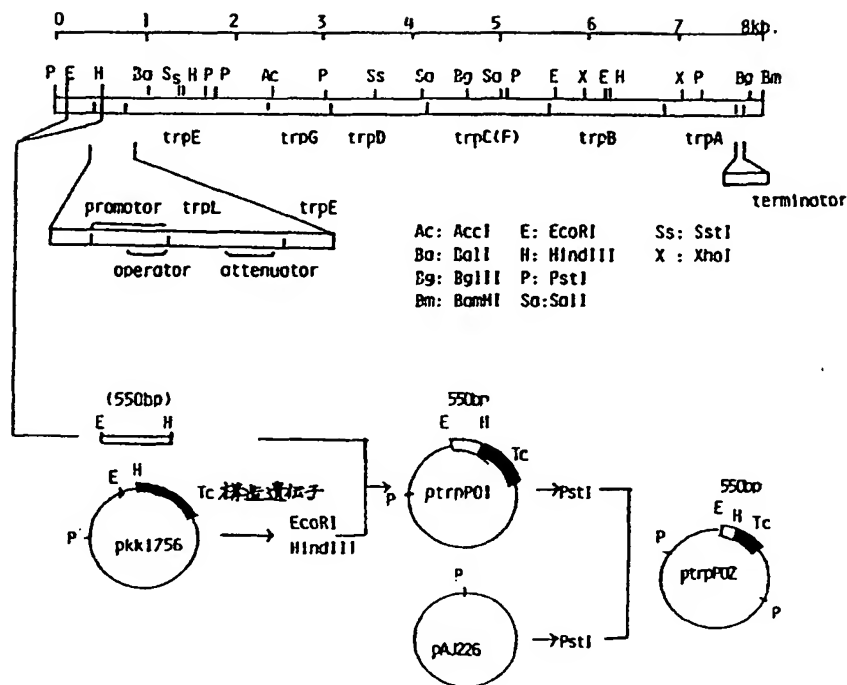
第 5 図

```

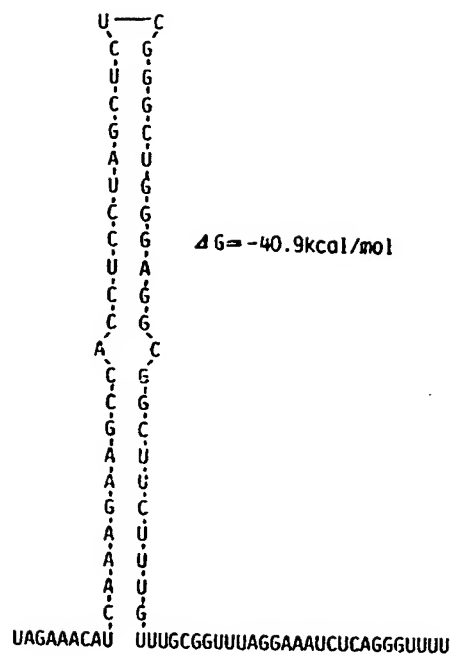
HaeIII
AGGAGGCGCG  TGGTGTGACT  ATTAGCTGCG  CGATTATCAA  CAAGACTCGG  CTGAATGCGG  CCAAGATTGA
TCTCTGGGCG  ACCACACTGA  TAATGAGGCG  GCTAATAGTT  GTTCTGAGGC  GACTTACGGG  GGTTCCTACT
AluI
CTTGGATGCA  GTGGTAGAG  CTGGCGAAGC  TACACAGAA  CCCAAATG  ATTGATAGTT  GAGCAGACT T
GAACCTACGT  CAGGCATCTC  GAGCGCTTTG  ATGTGTTTCT  GGTTTTTTAC  TAAATATTA  CTCGTGCGA A
-35 -10 HindIII

```

第 4 図



第 6 図



第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. 4

// C 12 P 21/02
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:13)
 (C 12 P 13/22
 C 12 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

6712-4B

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和61年特許願第87600号

2. 発明の名称

トリアトファンオペロン、トリアトファンオペロンにコード
されるペプチド及び蛋白、トリアトファンオペロンの遺伝子
発現利用方法及びトリアトファンの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中央区京橋一丁目 5番 8号

名称 (005) 味の素株式会社

代表者 取締役社長 武田 勝彦

4. 補正命令の日付

自來

5. 補正により増加する発明の数 なし

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄

および図面（第1図、第2図、第4図）

Ex. 6. $\bar{4}$

Figure 1

2000

第一區

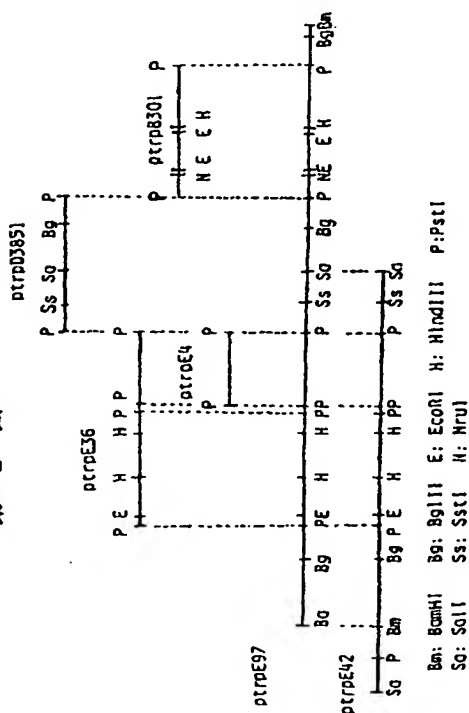
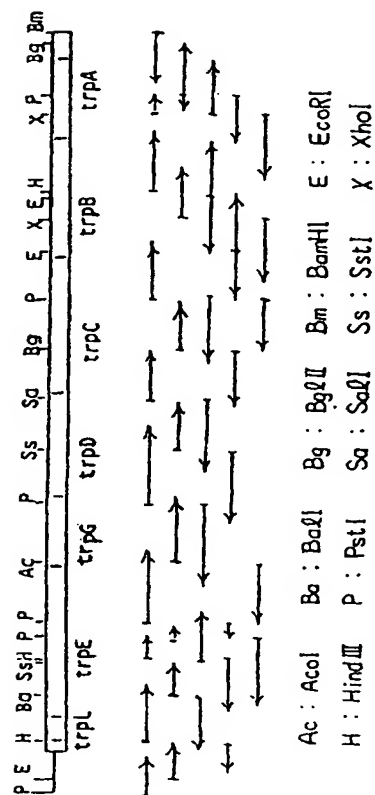


图 2 第



7. 補正の内容

(1) 明細四第11頁11~14行目「なお、第2式は・・・配列を示す。）」を「尚、第2式はtrp E、第3式はtrp G、第4式はtrp D、第5式はtrp C、第6式はtrp B、第7式はtrp A各構造遺伝子の塩基配列から推定される各アミノ酸配列を示す。）」と訂正する。

(2) 第1図、第2図、第4図を別紙の通り訂正する。

以上

第 4 図

